

19 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

11 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 691 465

21 N° d'enregistrement national :

92 06361

51 Int Cl³ : C 07 K 5/10, 17/10, A 61 K 37/02, 9/50, 7/00, 47/48

12 DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22 Date de dépôt : 25.05.92.

30 Priorité :

71 Demandeur(s) : FABRE MEDICAMENT Pierre — FR.

43 Date de la mise à disposition du public de la
demande : 26.11.93 Bulletin 93/47.

56 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche : Se reporter à la fin du présent fascicule.

72 Inventeur(s) : Dussourd d'Hinterland Lucien, Cousse
Henn, Pineil Anne-Marie et Martinez Jean.

60 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

73 Titulaire(s) :

74 Mandataire : Cabinet Regimbeau Martin Schrimpf
Warcoïn Ahner.

54 Complexes comprenant au moins un peptide dérivé de l' α MSH, peptide, microsphère, médicament et composition galénique les comprenant.

57 La présente invention concerne un complexe du type comprenant au moins un peptide, capable d'induire une activité anti-inflammatoire, anti-allergique ou immunosuppressive vis-à-vis des interleukines du groupe IL1-IL6- α TNF, dans lequel le peptide présente une séquence d'au moins quatre acides aminés extraits de l' α MSH, ainsi que les dérivés de ces molécules sous forme de sels, d'esters ou d'amides, un peptide dérivé de l' α MSH et une microsphère comprenant au moins le complexe tel que défini.

L'invention concerne également un médicament ou une composition galénique comprenant un complexe, un peptide ou une microsphère.

FR 2 691 465 - A1



La présente invention concerne des complexes du type comprenant au moins un peptide dérivé de l' α -MSH et capable d'induire une activité anti-inflammatoire, anti-allergique ou immunosuppressive vis-à-vis des interleukines du groupe IL1 - IL6 - α -TNF.

L'étude des peptides neurotransmetteurs, en particulier ceux de la classe des Enképhalines et Endorphines a fait l'objet de nombreux travaux concernant leur rôle de médiateurs et de modulateurs, dans certaines réponses vasculaires et nerveuses liées à des désordres cutanés.

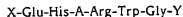
Ces peptides font partie du système "endorphine-lipotropine" et sont concentrés dans l'axe "hypothalamique - neurohypophysaire" qui induit leur synthèse. Parmi les peptides dérivant d'un même précurseur la "Pro-Opio-Mélanocortine" il faut citer l'ACTH, l' α -MSH et la β -endorphine.

L' α -MSH ou Mélanotropine est connue pour sa capacité d'activer et de réguler les différents processus d'induction et de transduction cellulaires de la mélanogénèse.

La présente invention repose sur la mise en évidence de l'activité biologique de peptides dérivés de l'ACTH et de l' α -MSH notamment lorsqu'ils sont utilisés sous forme de complexes avec une matrice polysaccharidique.

Plus particulièrement, la présente invention concerne un complexe du type comprenant au moins un peptide capable d'induire une activité anti-inflammatoire, anti-allergique ou immuno-suppressive vis-à-vis des interleukines du groupe IL1 - IL6 - α -TNF, présentant une séquence d'au moins quatre acides aminés extraits de l' α -MSH, lesdits acides aminés étant sous forme naturelle ou non, conjugués physiquement ou chimiquement à un élément polysaccharidique de haut poids moléculaire.

Parmi les séquences peptidiques utilisables selon l'invention, il faut citer les séquences de formule :



dans laquelle A représente Phe ou DPhe, et X et Y sont choisis parmi :

- les fonctions acides ou aminées de l'acide correspondant,
- une séquence d'acides aminés ne comprenant pas plus de quatre acides aminés,

ainsi que les dérivés de ces molécules sous forme de sels, d'esters ou d'amides.

Dans un mode préféré de l'invention, X est choisi parmi HMet-, HNLe-, H-Ser-Tyr-Ser-Met-, H-Ser-Tyr-Ser-Nle, Ac-Nle-, Ac-Leu-, Ac-Ile-, et Y
5 choisi parmi -NH₂, -OH.

Les séquences d'acides aminés mentionnées précédemment peuvent être des séquences d'acides aminés naturels ou des séquences d'acides aminés non naturels, de même dans certains cas, il est possible que certains de ces acides comportent des fonctionnalisations, par exemple de
10 glycosylations ; il doit être entendu que l'ensemble de ces formes est couvert dans la présente description.

Dans les complexes selon la présente invention, l'élément polysaccharidique est de préférence un polysaccharide réticulé qui peut être d'origine bactérienne, par exemple il peut provenir de souches de type
15 *Klebsiella* comme *Klebsiella pneumoniae*.

Le complexe peut être réalisé par réaction chimique et donc établissement d'une liaison covalente entre l'élément polysaccharidique servant de matrice et le peptide, et/ou une conjugaison physique dans laquelle l'élément polysaccharidique et le peptide sont liés uniquement par
20 des interactions non covalentes.

Ce type de complexe présente l'intérêt de pouvoir être aisément mis sous forme d'une microsphère en le recouvrant de feuillets d'acides gras et/ou de phospholipides selon une technologie qui a été décrite de façon générale sous la terminologie de biovecteurs supra-molé-
25 culaires.

Ce type de microparticules présente l'avantage de protéger les principes actifs peptidiques contre l'hydrolyse des enzymes de l'épiderme tels que les exopeptidases, le endopeptidases, les aminopeptidases, les carboxypeptidases, ou les dipeptidases et leur permettre ainsi
30 d'atteindre les récepteurs cellulaires.

Ces micro-particules ou biovecteurs transcutanés comprennent ainsi outre un noyau polysaccharidique sur lequel se trouve fixé le principe actif, au moins une couche lamellaire de lipoprotéines et de phosphatides.

On préfère en général utiliser un polysaccharide naturel ou un polysaccharide réticulé obtenu par exemple par traitement à l'épichlorhydrine sur lequel on fixe les chaînes latérales des composés peptidiques précédemment décrits. Ce noyau matriciel actif ainsi réalisé est ensuite entouré de différentes couches lamellaires de phosphatides et de lipoprotéines à hauts poids moléculaires. Selon un mode préféré de la présente invention, les acides gras sont faiblement greffés et les phospholipides interdigités. Le diamètre de ces biovecteurs peut être standardisé par passages successifs sur une presse Manton-Gaulin avec des pressions appropriées. Les biovecteurs sont ensuite lyophilisés ou atomisés à des températures inférieures à 60 ou 80°C de façon à maintenir l'activité des principes actifs.

Comme cela a été indiqué précédemment, les dérivés peptidiques de la présente invention sont utilisés de préférence sous forme de sels, d'esters ou d'amides avec des molécules biochimiques présentant au moins quatre atomes de carbone alicyclique et dont le rôle est de faciliter la liaison des composés peptidiques avec des récepteurs de classe G des membranes cellulaires ainsi que les processus de transduction par activation de l'AMPC. Ces formes particulières présentent en outre l'avantage en utilisant des groupements biochimiques connus pour leur activité inhibitrice ou bloquante des phosphodiesterases, d'augmenter la durée de vie des complexes selon la présente invention.

Parmi ces types de dérivés, il faut citer les sels, les esters ou les amides

- d'acides alcools ;
- de diacides ;
- de nucléotides non naturels,

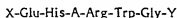
notamment les acides-alcools et les diacides choisis parmi ceux comprenant de trois à six atomes de carbone, ainsi que les dérivés acylés ou diacylés du glycol ou du glycérol, par exemple les acides hydroxybutyriques ou méthylhydroxybutyriques.

Il est également possible d'utiliser des nucléotides non naturels présentant un groupement triphosphate en position trois, avec un radical CH_2 au lieu de O.

Parmi les produits permettant de protéger les chaînes peptidiques il faut citer :

- l'acide méthyl-malonylique ($\text{CO}_2\text{H}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CO}_2\text{H}$)
- l'acide β -hydroxybutyrique ($\text{CH}_3-\text{CHOH}-\text{CH}_2-\text{CO}_2\text{H}$)
- l'acide β -hydroxybutyrylique ($\text{CH}_3-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CO}_2\text{H}$)
- le diacyl glycérol
- le nucléotide guanosine triphosphate, dans lequel le groupement triphosphate contient en position 3 un radical - CH_2 en remplacement de -O-.

- 10 La présente invention concerne également un peptide biologiquement actifs comprenant au moins une séquence de formule :



dans laquelle A représente Phe ou DPhe, et X est choisi parmi HMet-, HNle-, H-Ser-Tyr-Ser-Met-, H-Ser-Tyr-Ser-Nle-, Ac-Nle-,

- 15 Ac-Leu-, Ac-Ile-, et Y choisi parmi - NH_2 , -OH

D'une manière préférentielle, il comprend au moins une des séquences suivantes :

- 1) H-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly - NH_2
 - 2) H-Ser-Tyr-Ser-Nle-Glu-His-DPhe-Arg-Trp-Gly - NH_2
 - 20 3) H-Nle-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-OH
 - 4) H-Nle-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly- NH_2
 - 5) H-Met-Glu-His-DPhe-Arg-Trp-Gly- NH_2
 - 6) Ac-Nle-Glu-His-DPhe-Arg-Trp-Gly- NH_2
 - 7) Ac-Leu-Glu-His-Dphe-Arg-Trp-Gly- NH_2
 - 25 8) Ac-Ile-Glu-His-Dphe-Arg-Trp-Gly- NH_2
- notamment lorsqu'ils se présentent sous formes de sels, d'esters ou d'amides tels qu'ils ont été décrits précédemment.

- Les peptides 5 à 8, dont les séquences possèdent en position 4 l'amino-acide DPhényl sont particulièrement orientés vers une stimulation
- 30 des processus de mélanogénèse par activation de la tyrosinase mélanocytaire.

Les séquences peptidiques selon la présente invention peuvent être obtenues par l'un des procédés quelconques connus de l'homme de métier, notamment elles peuvent être obtenues par coupure à partir de l'ACTH naturelle d'origine porcine ou autre, mais elles peuvent être également obtenues par synthèse chimique et/ou dans le cas où les séquences peptidiques sont plus importantes, obtenues par des techniques de recombinaison génétique.

En tout état de cause, compte-tenu la plupart du temps, de la faible dimension de ces peptides, la synthèse chimique est tout à fait possible et permet d'obtenir des produits très purs.

Lorsque l'on utilise la fragmentation enzymatique, celle-ci peut conduire à des mélanges de produits, dans certains cas, il est possible d'utiliser directement certains de ces mélanges pour la réalisation des complexes selon la présente invention.

La présente invention comprend également les dérivés peptidiques précédents, mais obtenus par racémisation, ainsi que par synthèse peptidique de ces dérivés racémisés.

La racémisation porte sur certaines séquences peptidiques et présente l'intérêt d'orienter ces molécules vers une activité pharmacologique spécifique d'activation de la mélanogénèse par stimulation des tyrosinases et des mélanosomes.

Les complexes selon l'invention, les peptides ainsi que les micro-particules tels que définis précédemment, sont plus particulièrement utilisables dans des compositions dermatologiques par application topique externe en association avec un excipient de type connu pour réaliser des crèmes, des lotions, des sprays, ou tout autre forme galénique appropriée. Ces compositions dermatologiques peuvent être aussi bien utilisées en cosmétologie qu'en dermo-cosmétologie, dans ce cas la présente invention concernera évidemment les médicaments caractérisés en ce qu'ils comportent un complexe selon la description précédente, ou une microsphère et/ou un peptide tel que décrit précédemment.

Les complexes ainsi que les peptides selon l'invention présentant les caractéristiques biologiques d'être des anti-inflammatoires,

des anti-allergiques, et des immuno-suppresseurs vis-à-vis des interleukines du groupe IL1 - IL6 - γ TNF, pourront donc être utilisés dans un grand nombre de thérapies, tant curatives que préventives comme cela sera démontré ci-après.

- 5 Bien entendu, ces molécules conservent un axe d'activation de la mélanogénèse par stimulation des tyrosinases des mélanosomes qui pourront également être mises à profit lorsque cela pourra se révéler nécessaire.

- 10 La présente invention concerne également une composition galénique caractérisée en ce qu'il s'agit de préparations dermato-cosmétologiques, sous forme de solutions, de lotions, d'émulsions ou de crèmes utilisées comme accélérateur de bronzage de la peau et comprenant au moins un des complexes ou peptides décrits précédemment.

- 15 D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples ci-après.

Exemple 1 :

- 20 Obtention des fractions peptidiques à partir de l'ACTH de porc

Le fractionnement est obtenu par action de la trypsine selon la technique de SANGER.

- 25 L'action de la trypsine s'effectue préférentiellement sur les liaisons Arg et Lys. L'hydrolyse de la fraction 24 AA Terminal de l'ACTH donne les fragments peptidiques suivants :

- | | | |
|----|-------------------------|------------------|
| | 1) 3 fragments d' 1 A-A | (146 < PM < 174) |
| | 2) 2 fragments de 3 A-A | (378 < PM < 425) |
| | 3) 1 fragment de 4 A-A | (PM 453) |
| 30 | 4) 1 fragment de 8 A-A | (PM 1280) |
| | 5) 1 fragment de 18 A-A | (PM 2302) |

Parmi les 4 premiers fragments peptidiques, seul le fragment 4 de 8 amino-acides correspond à la séquence terminale de l' α MSH.

- 1000 Unités d'ACTH poudre (SIGMA A 6303, 5 mg) sont dissouts dans 0,9 ml de tampon Tris à pH 8,5.

- on ajoute 500 Unités de Trypsine (SIGMA T. 1005) en solution dans 100 ml de tampon Tris 0,05 M à pH 8,5 (l'enzyme est solubilisée extemporanément).

- on met au bain-marie, maintenu à 25°C, pendant 10 minutes.

- on ajoute un pH 4,5 et on chauffe 10 minutes à 100°C.

Les fractions peptidiques ainsi obtenues sont séparées par chromatographie sur gel PHARMACIA G-25 et G-15.

La différence de poids moléculaire entre ces fractions peptidiques en facilite la purification par chromatographie d'exclusion sur gel Pharmacia G-25. En particulier pour la fraction 4 composée de 8 amino-acides et dont le poids moléculaire est de 1280 daltons.

- on élue avec du Tampon Tris à pH 7,5.

les fractions recueillies sont lyophilisées et analysées par électrophorèse (PHAST PHARMACIA) sur gel d'Acrylamide.

Exemple 2 :

20 Synthèse des analogues peptidiques

Le dérivé 4 a été préparé par la méthode de MERRIFIELD à partir d'une résine chlorométhylée (copolymère de styrène à 1% de divinylbenzène). La Boc-Glycine a été fixée sur cette résine par la méthode de GISIN. Le degré de substitution est de 0.6 meq de Boc-Gly par gramme de résine. La stratégie BOC a été utilisée, avec les acides aminés suivants : Boc-Trp(For), Boc-Arg(Tos), Boc-Phe, Boc-His(Boc), Boc-Glu(OBzl), Boc-Met, Boc-Nle. Le réactif BOP' a été utilisé comme agent de couplage. La déprotection finale a été effectuée par la technique du "Low-High" HF. Les peptides ont été purifiés par HPLC et identifiés par analyse d'acides aminés, ou RMN du ^1H à 360 MHz.

Les composés 3, 5, 6 et 9 ont été préparés en utilisant une résine benzhydramine (copolymère de styrène à 1 % de divinylbenzène

fonctionnalisé par une -aminobenzyle). Le degré de fixation du premier acide aminé (Boc-Gly ou Boc-Val) est de 0.5 meq/g de résine approximativement. La stratégie BOC a été utilisée avec les acides suivants : Boc-Trp(For), Boc-Arg(Tos), Boc-Phe, Boc-His(Boc), Boc-Glu(OBzl), Boc-Met, 5 Boc-Nle, Boc-DPhe, Boc-Pro, Boc-Lys(Z-Cl-Z), Boc-Gly. L'acétylation des composés 8,9 et 10 a été effectuée en utilisant AcOSu, le peptide étant fixé sur la résine. Le réactif BOP a été utilisé comme agent de couplage. La déprotection finale a été effectuée par la technique du "Low-High" HF. Les peptides ont été purifiés par HPLC et identifiés par analyse d'acide 10 aminés, ou RMN du ^1H   360 MHz.

A titre d'exemple, les constantes physiques de quelques composés sont données.

(3) H-Nle-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-OH

15

PF = 130 C, décomposition.

$[\alpha]_D^{25} - 5$ (c = 0.5 DMF).

HPLC : colonne C_{18} , 5 m, débit 7 mL/min, détection 279 nm, solvant d'élution TFA 0.1%/acétonitrile 77/23 v/v, temps de rétention 28.80 min.

20

^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$) ppm : Nle (3.77, 1.62, 1.24, 0.82) ; Glu (8.53, 4.32, 1.82-1.71, 2.25) ; His (8.11, 4.53, 2.98-2.83) ; Phe (8.06, 4.47, 2.99-2.77, 7.25-7.1) ; Arg (8.32, 4.30, 1.69-1.55, 1.45, 3.07) ; Trp (8.02, 4.59, 3.16-3.00, 10.78, 7.15, 7.58, 7.30, 7.04, 6.96) ; Gly (8.18, 3.70).

25

(4) H-Nle-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-NH₂

PF = 120 C, décomposition.

$[\alpha]_D^{25} - 7$ (c = 0.4 DMF).

HPLC : colonne C_{18} , 5 m, débit 7 mL/min, détection 279 nm, solvant d' lution TFA 0.1%/ac tonitrile 77/23 v/v, temps de rétention 30.45 min.

30

^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$) ppm : Nle (4.76, 1.62, 1.24, 0.82) ; Glu (8.54, 4.32, 1.86-1.72, 2.24) ; His (8.09, 4.53, 2.95-2.82) ; Phe (8.09, 4.53, 3.00-2.78, 7.3-7.0) ; Arg (8.36, 4.29, 1.54-1.68, 1.45, 3.07) ; Trp (8.07, 4.53, 3.16-3.01, 10.80, 7.19, 7.56, 7.30, 6.96) ; Gly (8.18, 3-67-3.54).

35

(6) Ac-Nle-Glu-His-Dphe-Arg-Trp-Gly-NH₂

PF = 110°C décomposition

[α]_D = 31,4 (c=0,35 DMF)

Chromatographie en couche mince (plaques de gel de

5 silice 60 F₂₅₄ Merck, Darmstad, Allemagne) :

Rf = 0,10 (Acétate d'éthyle 50, Pyridine 20, acide acétique 5, eau 10).

Rf = 0,26 (Acétate d'éthyle 40, Pyridine 20, acide acétique 5, eau 10).

HPLC : appareil Merck-Hitachi, colonne SFCC C₁₈ (10 μ M)

22,5 x 150 mm, détection 279 nm, solvant isocartique TFA 0,1%/Acétonitrile

10 73:27, débit 7ml/min, temps de rétention 29,6 min.

Analyse d'acides aminés, HCl 6N, 110°C, 24 heures : Nle

1,00 ; Glu 0,95 ; His 0,92 ; Phe 0,96 ; Arg 0,92 ; Trp 0,88 ;

Gly 0,98.

15 (7) Ac-Leu-Glu-His-Dphe-Arg-Trp-Gly-NH₂

PF = 120°C, décomposition

Chromatographie en couche mince (plaques de gel de

silice 60F₂₅₄ Merck, Darmstad, Allemagne) :

Rf = 0,09 (Acétate d'éthyle 50, Pyridine 20, acide acétique 5, eau 10).

20 Rf = 0,24 (Acétate d'éthyle 40, Pyridine 20, acide acétique 5, eau 10).

HPLC, appareil Merck-Hitachi, colonne SFCC C₁₈ (10 μ M)

22,5 x 150 mm, détection 279 nm, solvant isocartique TFA 0,1%/Acétonitrile

73:27, débit 7ml/min, temps de rétention 30,5 min.

Analyse d'acides aminés, HCl 6N, 110°C, 24 heures : Leu

25 1,00 ; Glu 0,93 ; His 0,92 ; Phe 0,94 ; Arg 0,93 ; Trp 0,85 ; Gly 0,97.

(8) Ac-Ile-Glu-His-Dphe-Arg-Trp-Gly-NH₂

PF = 110°C, décomposition

Chromatographie en couche mince (plaques de gel de

30 silice 60 F₂₅₄ Merck, Darmstad, Allemagne) :

Rf = 0,11 (Acétate d'éthyle 50, Pyridine 20, acide acétique 5, eau 10).

Rf = 0,26 (Acétate d'éthyle 40, Pyridine 20, acide acétique 50, eau 10).

HPLC : appareil Merck-Hitachi, colonne SFCC C₁₈ (10 μ M) 22,5 x 150 mm, détention 279 nm, solvant isocratique TFA 0,1%/Acéto-nitrile 73:27, débit 7ml/min, temps de rétention 29,7 min.

Analyse d'acides aminés, HCl 6N, 110°C, 24 heures : Ile 1,00 ; Glu 0,96 ; His 0,90 ; Phe 0,95 ; Arg 0,94 ; Trp 0,86 ; Gly 0,95.

Exemple 3 :

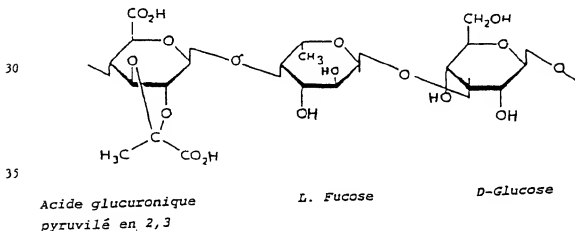
- 10 Synthèse du complexe contenant le peptide conjugué à un élément polysaccharidique

I. Structure de l'élément polysaccharidique

- 15 L'élément polysaccharidique utilisé pour synthétiser ce complexe est un exopolysaccharide sécrété par la souche *Klebsiella pneumoniae* type I, et sera codé DC-15.

Cet EPS est extrait du milieu de culture après élimination des cellules bactériennes. Après isolement et purification, le produit est séché et se présente sous forme d'une poudre de couleur blanche et très hygroscopique.

L'étude de la structure du DC-15 a permis de montrer qu'il était essentiellement composé d'une forme monomérique comprenant du D glucose, de l'acide D glucuronique, du L fucose et de l'acide pyruvique enchainés selon le schéma ci-dessous :



La présence de fonctions acétals, qui peuvent s'hydrolyser en milieu acide, conduit à travailler en milieu neutre ou basique afin d'éviter toute dégradation. Ces conditions entraînent des conséquences importantes au niveau de l'arrangement des chaînes polysaccharidiques en solution.

5

	<u>Composants</u>	%
	acides uroniques	23.7
	glucose	18
10	méthyl pentose	21.2
	acide pyruvique	5.6
	galactose	4.8
	azote total	0.28
	cendres	19.4
15	H ₂ O	13
	acides nucléiques	0.1
	protéines	1.4

20 2. Réaction du DC-15 avec le chlorure de magnésium

Le DC-15 (0.102 gr) est dissous dans 3 ml d'eau distillée. Une solution saturée de MgCl₂ (3 ml) est ajoutée par fractions à température ambiante et sous agitation.

25 3. Réaction du DC-15 avec le chlorure de l'acide succinique

Le DC-15 (200 mg) est dissous dans 2 ml d'eau distillée. On ajoute à cette solution 121 mg de Na₂CO₃, puis 100 µl de chlorure d'acide succinique. Le mélange est maintenu sous agitation à température

30

35 4. Réaction du DC-15 et de l'éthylène diamine

Le DC-15 (100 mg) est dissous dans 1 ml d'eau distillée. On

35

ajoute sous agitation 191 mg d'EDC et 100 mg de N hydroxysuccinimide. Quand la mélange est homogène, on ajoute 111 µl d'éthylène diamine et on laisse la réaction se poursuivre pendant deux heures.

5. Co-réticulation du DC-15 et de l'amidon soluble

L'amidon soluble (9 g) et le DC-15 (1 g) sont introduits dans un ballon de 250 ml muni d'une agitation mécanique. On ajoute 10 ml d'une solution de soude 3M et l'agitation est poursuivie jusqu'à obtention d'une solution homogène. On ajoute alors 390 µl d'épichlorhydrine et on laisse se poursuivre la réaction sous agitation jusqu'à obtention d'un gel (environ une heure). Le gel résultant est neutralisé, broyé par un appareil à hélice puis débarrassé des sels contaminants par centrifugation. Les suspensions obtenues sont ensuite extrudées à très haute pression (1400 bars) par la presse de French. Trois cycles d'extrusion sont nécessaires pour obtenir une suspension homogène de particules de taille inférieure à 50 nm. Les particules ultra-broyées sont ensuite séchées de façon non aggrégative par atomisation.

6. Acylation des nanoparticules polysaccharidiques

Dans un ballon de 50 ml, nous introduisons 500 mg de nanoparticules que nous dispersons dans 10 ml de dichlorométhane anhydre. On ajoute 400 mg de diméthylaminopyridine (DMAP) et 400 mg de chlorure d'acide palmitique ou stéarique. La suspension est agitée à 37°C pendant 24 h. Le dichlorométhane est ensuite évaporé à l'évaporateur rotatif. Les nanoparticules acylées sont alors lavées à l'éthanol (3 fois) puis conservées dans l'éthanol à - 20°C.

7. Incorporation du dérivé peptidique 6 dans des noyaux polysaccharidiques acides de 25 nm sous forme acylée, et synthèse de BVSM

Afin d'éviter une modification chimique des peptides incorporés dans les noyaux polysaccharidiques lors de l'étape de synthèse

suivante d'acylation, le peptide a été chargé dans des noyaux acides préalablement acylés. L'étude a été réalisée avec le dérivé 6) ACTH, à savoir 1 mole d'ACTH pour 2 moles d'acide du noyau polysaccharidique acide acylé par l'acide plamitique. Après chargement du peptide, le feuillet
5 phospholipidique des BVSM est synthétisé par co-incubation avec des lécithines d'oeuf dans des proportions de 200 % de phospholipides par poids de noyaux acylés. Ces noyaux ont en effet une couverture d'acides gras peu dense qui autorise le chargement en peptide mais qui nécessite également l'apport de quantités de phospholipides recouvrants plus importantes pour
10 assurer la stabilité structurale du BVSM.

Ces BVSM présentent un taux d'incorporation de peptide 6) ACTH par poids de BVSM (46,6 % par poids de noyaux acylés) avec un rendement de 90 % de peptide incorporé par rapport au peptide de départ.

Il est donc possible de synthétiser des BVSM chargés en
15 peptides avec d'excellents rendements permettant de limiter les pertes en peptide lors des synthèses. On constate en particulier qu'à chaque essai successif, les quantités initiales de peptides ont été augmentées mais que le rendement est toujours resté de 90 %.

20 8. Etablissement de la couronne phospholipidique

Une suspension de liposomes est préparée par sonication au bain de 75 mg de lécithines hydrogénées dans 10 ml d'eau distillée (30 mn). On ajoute progressivement sous agitation 1 ml d'une suspension éthanolique
25 de noyaux acylés. La suspension résultante est ensuite soniquée au bain pendant 30 mn.

Dosage de l'acide pyruvique contenu dans le DC-15 et dans les noyaux polysaccharidiques.

10 mg de polysaccharide sont dissous dans 5 ml d'HCl 0,1 N et
30 placés dans un tube à essai. La solution est maintenue trois heures à 100°C puis ramenée à température ambiante et neutralisée par de la soude 0,2 N. L'acide pyruvique hydrolysé est dosé à l'aide du kit Sigma par rapport à une courbe étalon réalisée avec des échantillons d'acide pyruvique témoins.

Exemple 4 :

Etude de l'activité immuno-suppressive vis-à-vis de l'interleukine IL 1

- 5 Test utilisé : contrôle de l'activité anti-IL1 sur les cellules de Langerhans
Thy 1.2⁺ et Ia⁺ de la souris C 57 BL/6

1. Matériel et méthodes

- 10 Des souris mâles C 57 - BL/6 âgées de 5 à 7 semaines,
réparties à raison de 4 par cage, avec libre accès à l'eau et à la nourriture
soumises à une photopériode de 12 h de lumière par 24 heures, reçoivent
quotidiennement et pendant 5 jours consécutifs une application topique du
15 peptide dans du propylène glycol (vol de 50 µl), sur la face dorsale de
l'oreille.

Le jour 6, les animaux sont sacrifiés. On procède au
prélèvement des oreilles avec séparation de la face dorsale et de la face
ventrale.

- 20 Les tissus de la face dorsale sont immergés dans de l'EDTA de
Na (0,020 M) pendant 2 h à 37°C.

Après incubation, l'épiderme est prélevé sous forme de feuillet
intact fixé à l'acétone et réhydraté dans du PBS (tampon phosphate).

- 25 Les CED (cellules épidermiques dendritiques) Thy 1-2⁺ et Ia⁺
sont identifiées par double marquage en immunofluorescence indirecte.
Le nombre de cellules par mm² est déterminé par les zones
périphériques de même surface, pour chaque feuillet épidermique.

Les CED "cellules épidermiques dendritiques" portant le
marqueur Ia⁺ ont été identifiées par l'utilisation d'un anticorps monoclonal
anti-Ia⁺.

- 30 Les feuillets épidermiques sont fixés à l'acétone, puis incubés
pendant 1 h à 37° C en présence de l'anticorps monoclonal anti-Ia⁺ et
marqué par la méthode de l'immunoperoxydase indirecte (kit).

Après incubation pendant 10 minutes à 37°C avec une solution
d'amino-éthyl-carbazol, la préparation est lavée au PBS.

35

Les CED Thy 1.2⁺ ont été indentifiées par double marquage en immunofluorescence indirecte. Les feuillets épidermiques ont été fixés à l'acétone puis réhydratés dans le PBS.

- 5 Les tissus marqués simultanément par des anticorps de souris anti-Thy 1.2⁺ dilués au 1:100 pendant 16 h à 4°C. Les échantillons de tissus ont été lavés trois fois dans du PBS pendant 60 mn puis incubés 60 mn à 37°C, soit avec des anticorps de chèvre anti-souris couplés à la rhodamine, dilués au 1:20, soit avec des anticorps de chèvre anti-lapin couplés à la fluorescéine (fluoresceine diluée au 1:20 dans le PBS. Les tissus ont ensuite
10 été lavés dans le PBS avant d'être montés comme décrit précédemment).

- Les témoins comportaient des feuillets épidermiques non marqués à l'anticorps primaire et incubés uniquement en présence des réactifs secondaires, afin de mettre en évidence d'éventuelles réactions
15 croisées avec les anticorps conjugués à la rhodamine et à la fluorescéine.

- Le nombre de cellules de Langerhans Ia⁺ ou de CED Thy 1.2⁺ par millimètre carré a été déterminé dans quatre zones périphériques de même surface pour chaque feuillet épidermique. Au moins quatre animaux ont été étudiés dans chacun des groupes. La densité de cellules de
20 Langerhans Ia⁺ et de CED Thy 1.2⁺ est indiquée pour chaque mesure.

2. Résultats

- Le tableau I résume les résultats mettant en évidence
25 l'activité immuno-suppressive des peptides selon l'invention obtenus à partir de 4 lots de 4 souris C57-BL6.

- Déjà à une concentration de 0,1 ng, les peptides provoquent une diminution de l'apparition des phénotypes de cellules dendritiques épidermiques de classe Thy 1.2⁺, effet qui est amplifié à la concentration
30 de 1 ng. En revanche, les peptides restent sous effet sur les phénotypes des cellules dendritiques épidermiques de classe Ia⁺, ce qui présente l'avantage de ne pas perturber le fonctionnement du système immunitaire cutané, et apporte la démonstration d'une action immuno-suppressive spécifique.

Ces résultats montrent également que les peptides selon l'invention, correspondant à des fragments (4-10) de l' α -MSH, ont un effet plus marqué que la molécule d' α -MSH (1-10), elle-même.

5

Exemple 5 :

Etude de la Mélanogénèse

10 Les difficultés rencontrées pour obtenir des cultures "in vitro" de mélanocytes normaux ou de grandes populations de mélanocytes, à partir de tissus d'animaux, obligent les chercheurs à utiliser des cellules tumorales de mélanomes de souris.

15 Ces techniques, si elles ont permis de mieux connaître les mécanismes fondamentaux, sont peu adaptées à l'évaluation des molécules dites activateurs de mélanogénèse.

20 Ces cellules tumorales sécrètent normalement et de façon abondante de la tyrosinase, ce qui présente l'inconvénient majeur d'amplifier les résultats, particulièrement lorsqu'il s'agit de composés à base de tyroxine.

La mélanogénèse est sous la dépendance de neuropeptides qui activent la tyrosinase ; l'évaluation de cette activation ne peut s'effectuer valablement que sur les mélanocytes normaux en culture.

25 On a mis au point un modèle expérimental de culture de mélanocytes d'embryons d'amphibiens, dont le système limbique se rapproche de celui des mammifères, et qui permet de réaliser le screening des différentes molécules avec une précision statistiquement significative.

On a utilisé des oeufs embryonnés de Triton Crète (Tritus Cristatus).

30 Les mélanocytes sont d'origine neurale. Ils sont prélevés dès les premiers jours de l'embryogénèse dans le neur ectoderme, et mis en culture dans du milieu de BARTH'S, enrichi en endoderme et contenant des dilutions croissantes des peptides à tester.

35

Après incubation à 25°C pendant 24 heures, l'activité des composés peptidiques s'apprécie par dosage de la mélanine contenue dans les mélanosomes, comparativement à des témoins non stimulés.

Le taux de mélanine par cellule est apprécié directement au
5 microscope confocal Zeiss-Scanning-Laser Microscope (S.M.L. Zeiss) par fluorescence.

1. Matériel et méthodes

10 Les mélanocytes sont prélevés à l'aide de micropipettes automatiques d'un Microscope Zeiss inversé, équipé pour la chirurgie cellulaire.

Les embryons sont immobilisés dans la chambre de manipulation du microscope, en milieu physiologique et atmosphère d'azote.

15 Les prélèvements s'effectuent avec précision, sous surveillance d'un écran d'ordinateur couplé à l'appareil et programmé.

Les mélanocytes prélevés sont mis en culture dans le milieu de BARTH'S contenant 3,5% de paraformaldéhyde pendant 30 minutes à 22°C.

On lave deux fois, à l'aide de la solution de BARTH'S.

20 Les cultures sont mises à incuber dans le milieu de BARTH'S conditionné par 1% d'extrait de triton d'endoderme de l'embryon à la température de 22°C

On ajoute des dilutions croissantes d'hormones peptidiques à 0,1 mg - 0,5 mg - 1 mg - et 1,5 mg pour 50 µl

25 On laisse incuber la culture pendant 20 à 24 heures à 22°C
Les cellules sont délicatement centrifugées à 300 g pendant 3 minutes.

Elles sont mises à incuber rapidement dans un milieu de BARTH'S en présence d'isothiocyanate de fluorescéine FITC pendant 30 minutes.

Après lavage avec 3,5% de paraformaldéhyde en solution de BARTH'S et centrifugées, elles sont mises en suspension, et fixées sur lames, selon les procédés classiques.

Le dosage de la mélanine s'effectue par analyse confocale microscopique à l'aide du microscope Zeiss S.L.M.

Les mesures s'effectuent par Argon-Laser à 488 nm et 514 nm en fluorescence avec objectif 63 x Plan-Néofluar en mode opératoire
5 préprogrammé.

Chaque image individuelle est visualisée sur écran et stockée sur disque.

Le taux de mélanine par cellule et le nombre de cellules traitées et témoins sont directement exprimés sous forme de graphique à
10 l'aide de l'ordinateur du microscope.

2. Résultats

Le tableau II représente les résultats pour un échantillon
15 peptidique (3) testé comparativement au témoin. L'échantillon témoin est représenté par une culture cellulaire en milieu de BARTH'S, non activée.

Il a été réalisé trois séries de cultures cellulaires selon un protocole rigoureusement identique.

Les doses d'hormones peptidiques ont été standardisées à 0,1 -
20 0,5 - 1 - et 1,5 mg.

Les taux de dopa-mélanine sont exprimés en μg pour cent mille cellules.

25

30

35

TABLEAU I

Echantillons	Doses Nanogr. [ng]	NOMBRE DE CELLULES Thy 1.2 ⁺ et Ia ⁺ par mm ² d'épiderme									
		Cellules Thy 1.2 ⁺				Moyenne	E	Cellules Ia ⁺			
		1	2	3	4			1	2	3	4
Témoins FG	-	380	376	387	410	388		498	502	500	510
I	0.1	298	302	310	305	303	22	490	495	496	500
	0.5	300	290	305	300	298	23.2	480	480	490	498
	1	288	285	280	276	272	29.9	476	482	487	499
II	0.1	290	280	285	292	286	26.3	470	445	435	450
	0.5	276	268	270	286	276	29.2	413	412	430	445
	1	260	262	260	270	263	32.3	413	420	425	432
III	0.1	323	320	318	321	320	17.6	490	500	495	505
	0.5	318	315	310	316	320	17.6	488	498	480	500
	1	316	312	310	312	312	19.6	400	495	470	492

Résultats exprimés sur 4 lots de 4 souris C 57 BL-6

I : Hydroxybutyryl (4 - 10) ACTH

II : Hydroxybutyryl (4 - 10) ACTH

III: (1 - 10) α MSH

T A B L E A U N° II

Echantillons testés	Doses Nanogrammes	Mélatine en microgrammes pour 1.10^5 cellules			Moyenne
		Série I	Série II	Série III	
Témoin Peptide	-	0,28 µg	0,33 µg	0,35 µg	0,35 µg
	0,1 ng	2,15 µg	2,22 µg	2,30 µg	2,22 µg
	0,5 ng	3,65 µg	3,55 µg	3,60 µg	3,60 µg
	1 ng	3,55 µg	3,60 µg	3,65 µg	3,60 µg
	1,5 ng	3,10 µg	3,15 µg	3,10 µg	3,17 µg

H-Nie-Glu-His-Phe-Arg-Tip-Gly-OH (3)

Exemple 6 :

Pharmacologie

- 5 Deux produits ont été testés comparativement sur l'évolution de l'hypersensibilité cutanée :
JL 641, peptide numéro 6 sous forme lyophilisée
JL 641 B, peptide numéro 6 sous forme de complexe polysaccharidique

10 1. Matériel et méthodes

- Des souris femelles C57 BL/6 âgées de 5 semaines sont réparties en 7 lots de 10 animaux (5 par cage) avec libre accès à l'eau et à la nourriture, soumises à une photopériode de 12 heures de lumière par 24
15 heures. Les animaux des lots I, II et III reçoivent quotidiennement et par application topique sur la peau rasée du dos le JL 641 lyophilisé (mis en solution dans du propylène glycol) sous un volume constant de 50 µl et pendant 5 jours consécutifs.

- Les animaux des lots IV, V et VI reçoivent identiquement du JL
20 641 préparé sous forme de Nanosomes Polysaccharidiques préparés selon l'exemple 3, codés JL 641 B

Pour chaque produit trois doses sont retenues :

- JL 641 : Lot I : 2,5 µg/souris/jour
25 Lot II : 0,5 µg/souris/jour
Lot III : 0,1 µg/souris/jour
JL 641 B : Lot IV : 2,5 µg/souris/jour
Lot V : 0,5 µg/souris/jour
Lot VI : 0,1 µg/souris/jour

- 30 Les animaux du lot VII servent de témoins (ils reçoivent seulement 50 µl de propylène glycol par application topique.

Au jour 5, trente minutes après la dernière application, toutes les souris sont sensibilisées avec 25 µl de DNFB (2,4-dinitro-1 fluoro

benzène à 2% dans un mélange 4:1 d'acétone et trioléine appliqué sur la région dorsale de peau rasée.

Au jour 6, on procède à une nouvelle sensibilisation par application de DNFB.

Au jour 11, l'épaisseur des oreilles des souris est mesurée à l'aide d'un micromètre afin d'obtenir des valeurs de base puis les oreilles sont stimulées par application de 20 µl de DNFB à 0,8%.

Au jour 12, l'épaisseur des oreilles est à nouveau mesurée. On établit la valeur moyenne de l'épaississement des oreilles pour les souris des lots I, II, III, IV, V et VI qui ont reçu les produits à étudier, ainsi que pour les souris du lot VII qui n'ont eu que propylène glycol.

Le pourcentage de suppression éventuelle sera exprimé par le calcul suivant :

$$\frac{T - E}{T} \times 100$$

T représentant l'épaisseur moyenne des oreilles du lot témoin et E l'épaisseur moyenne des oreilles des différents lots.

2. Résultats :

Les résultats sont reportés sur les tableaux V et VI ci-après :

Tableau V

% DE SUPPRESSION PAR RAPPORT AU LOT TÉMOIN SELON LA FORMULE : $\frac{T - E}{T} \times 100$					
LOT I JL 641 LYOPHILISÉ 2,5 µg/souris/jour		LOT II JL 641 LYOPHILISÉ 0,5 µg/souris/jour		LOT III JL 641 LYOPHILISÉ 0,1 µg/souris/jour	
Oreille Gauche	Oreille Droite	Oreille Gauche	Oreille Droite	Oreille Gauche	Oreille Droite
- 31,53	- 32,50	- 30,67	- 30,63	- 30,14	- 31,65

Tableau VI

Traitement JL 641 B

% DE SUPPRESSION PAR RAPPORT AU LOT TEMOIN SELON LA FORMULE : $\frac{T - E}{T} \times 100$					
LOT IV JL 641 B 2,5 µg/souris/jour		LOT V JL 641 B 0,5 µg/souris/jour		LOT VI JL 641 B 0,1 µg/souris/jour	
Oreille Gauche	Oreille Droite	Oreille Gauche	Oreille Droite	Oreille Gauche	Oreille Droite
- 67,66	- 67,89	- 67,38	- 70,28	- 53,27	- 55,66

L'examen des tableaux montre que l'activité du peptide JL 641 sous forme lyophilisée et administrée par voie topique diminue la réaction d'hypersensibilité cutanée d'environ 30%.

Le même peptide présenté sous forme microcapsulé de Nanosomes à structures polysaccharidiques (JL 641 B) induit une forte diminution de l'hypersensibilité cutanée comprise entre 53 et environ 70%.

Ces résultats montrent non seulement une bonne activité du peptide seul, mais également une potentialisation particulièrement inattendue lorsqu'il est couplé à un polysaccharide.

REVENDECATIONS

1. Complexe du type comprenant au moins un peptide capable d'induire une activité anti-inflammatoire, anti-allergique ou immuno-suppressive vis-à-vis des interleukines du groupe IL1 - IL6 - ~~α~~ TNF, 5 présentant une séquence d'au moins quatre acides aminés extraits de l' MSH, lesdits acides aminés étant sous forme naturelle ou non, conjugués physiquement ou chimiquement à un élément polysaccharidique de haut poids moléculaire.
- 10 2. Complexe selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'élément polysaccharidique est un polysaccharide réticulé.
3. Complexe selon 1 à 2 caractérisé en ce que le polysaccharide est d'origine bactérienne.
4. Complexe selon 1 à 3 caractérisé en ce que le polysaccharide 15 provient d'une souche de *Klebsiella pneumoniae*.
5. Complexe selon 1 à 4 caractérisé en ce qu'il comprend un peptide de formule :
- X-Glu-His-A-Arg-Trp-Gly-Y
- dans laquelle A représente Phe ou DPhe, et X et Y sont choisis parmi :
- 20 - les fonctions acides ou aminées de l'acide aminé correspondant
 - une séquence d'acide aminé ne comprenant pas plus de quatre acides aminés
 ainsi que les dérivés de ces molécules sous forme de sels, d'esters ou d'amides.
- 25 6. Complexe selon 1 à 5 caractérisé en ce que X est choisi parmi HMet-, HNle-, H-Ser-Tyr-Ser-Met-, H-Ser-Tyr-Ser-Nle-, Ac-Nle-, Ac-Leu-, Ac-Ile, et Y choisi parmi -NH₂, -OH.
7. Complexe selon 1 à 6 caractérisé en ce que les dérivés des peptides sont choisis parmi les sels, les esters et les amides des 30 groupements biochimiques inhibant ou bloquant les phosphodiesterases.

8. Complexe selon 1 à 7 caractérisé en ce que les dérivés des peptides sont choisis parmi les sels, les esters ou les amides

- d'acides alcools
- de diacides
- de nucléotides non naturels.

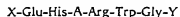
9. Complexe selon 1 à 8 caractérisé en ce que les acides alcools et les diacides sont choisis parmi les acides contenant de trois à six atomes de carbone et les dérivés acylés ou diacylés du glycol ou du glycérol.

10. Complexe selon 1 à 9 caractérisé en ce que les acides alcools sont les acides hydroxybutyriques et méthyl hydroxybutyriques.

11. Complexe selon 1 à 10 caractérisé en ce que les nucléotides non naturels présentent un groupement triphosphate en position 3 avec un radical $-CH_2$ au lieu de $-O-$.

12. Complexe selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une séquence d'acides aminés partiellement racémisée.

13. Peptide biologiquement actif caractérisé en ce qu'il comprend au moins une séquence de formule :



dans laquelle A représente Phe ou DPhe, X est choisi parmi HMet-, HNle-, H-Ser-Tyr-Ser-Met-, H-Ser-Tyr-Ser-Nle, Ac-Nle-, Ac-Leu-, Ac-Ile, et Y choisi parmi $-NH_2$, $-OH$.

14. Peptide selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les séquences :

- 1) H-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly - NH_2
- 2) H-Ser-Tyr-Ser-Nle-Glu-His-DPhe-Arg-Trp-Gly - NH_2
- 3) H-Nle-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-OH
- 4) H-Nle-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly- NH_2
- 5) H-Met-Glu-His-DPhe-Arg-Trp-Gly- NH_2
- 6) Ac-Nle-Glu-His-DPhe-Arg-Trp-Gly- NH_2

7) Ac-Leu-Glu-His-Dphe-Arg-Trp-Gly-NH₂

8) Ac-Ile-Glu-His-Dphe-Arg-Trp-Gly-NH₂

ainsi que les dérivés de ces molécules sous forme de sels, d'esters ou d'amides.

5 15. Peptides selon l'une des revendications 13 et 14 caractérisés en ce qu'ils sont choisis parmi les sels, les esters et les amides de groupements biochimiques inhibant ou bloquant les phosphodiestérase.

16. Peptide selon l'une des revendications 13 à 15, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une séquence en acides aminés partiellement
10 racémisée.

17. Microsphère caractérisée en ce qu'elle contient au moins un complexe selon l'une des revendications 1 à 12 recouvert de feuillets d'acides gras et/ou de phospholipides.

18. Microsphère selon la revendication 17 caractérisée en ce
15 que les acides gras sont faiblement greffés et que les phospholipides sont interdigités.

19. Médicament caractérisé en ce qu'il comprend un complexe selon 1 à 12, un peptide selon 13 à 16, ou une microsphère selon 17 et 18, administré par voie orale ou injectable.

20. Composition galénique pour application topique externe caractérisée en ce qu'elle comprend un complexe selon 1 à 12, une microsphère selon 17 et 18, ou un peptide selon 13 à 16.

21. Composition galénique selon la revendication 20, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une composition dermatologique pouvant
25 être aussi bien utilisée en cosmétologie qu'en dermo-cosmétologie.

22. Composition galénique selon l'une des revendications 20 et 21, caractérisée en ce qu'il s'agit de préparations dermato-cosmétologiques, sous forme de solutions, de lotions, d'émulsions ou de crèmes utilisées comme accélérateur de bronzage de la peau, comprenant au moins un des
30 complexes ou peptides selon les revendications 1 à 16.

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FR 9206361
FA 471884
Page 1

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications encombrées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	EP-A-0 381 070 (FARMHISPANIA SA) 8 Août 1990 * page 6, ligne 13 - page 6, ligne 16 *	1-2,5-6
X	NL-A-6 509 727 (ORGANON NV) 30 Janvier 1967 * exemple 2 *	13-14,16
X	EP-A-0 232 697 (A BERTOLINI) 19 Août 1987 * revendication 1 *	13-14, 16,19
X	EP-A-0 146 113 (D ADERHOLD) 26 Juin 1985 * revendication 4 *	13,14
X	EP-A-0 292 291 (UNIVERSITY PATENTS INC) 23 Novembre 1988 * le document en entier *	13-14, 16,19
A	WO-A-9 003 798 (CANCER RESEARCH CAMPAIGN TECHNOLOGY LIMITED) 19 Avril 1990 * revendication 1 *	1
X	PEPTIDES vol. 10, no. 2, Février 1989, FAYETTEVILLE, N Y, USA pages 361 - 368 B E BECKWITH ET AL. 'the effects of structure-conformation modifications of melanotropin analogs on learning and memory; d-amino acid substituted linear and cyclic analogs' *composé 4, tableau 1*	13-16,19
-/-		
Date d'achèvement de la recherche 10 FEVRIER 1993		Examiné par p. masturzo
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'ensemble d'un mais non revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet identifiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons M : membre de la même famille, document correspondant</p>		

FPO FORM 100 (REV. 1/84)

INSTITUT NATIONAL

de la

PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheN° d'enregistrement
national

FR 9206361

FA 471884

Page 2

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Chaque document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY. vol. 30, no. 11, Novembre 1987, WASHINGTON US pages 2126 - 2130 V J HRUBY ET AL. 'alpha-melanotropin: the minimal active sequence in the frog skin bioassay' * tableau 1 *	13-16,19
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 112, no. 19, 7 Mai 1990, Columbus, Ohio, US; abstract no. 172440r, M LOW ET AL. 'role of chain termini in selective steroidogenic effect of ACTH/MSH (4-10) on isolated adrenocortical cells' page 96 ; colonne G ; & PEPTIDES vol. 11, no. 1, 1990, FAYETTEVILLE, N Y, USA pages 29 - 31	13-16,19
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 100, no. 1, 2 Janvier 1984, Columbus, Ohio, US; abstract no. 630p, J M VAN REE 'the influence of neuropeptides related to pro-opiomelanocortin on acquisition of heroin self-administration of rats' page 54 ; colonne DR ; & LIFE SCIENCES vol. 33, no. 23, 1983, pages 2283 - 2289	13-16,19
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl. 5)
Date d'achèvement de la recherche 10 FEVRIER 1993		Examinateur p. masturzo
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons A : membre de la même famille, document correspondant</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'un motif une revendication ou article-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document interne</p>		

de la

établi sur la base des dernières revendications déposées avant le commencement de la recherche

2

EPO FORM 1503 01.87 (P0412)

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FR 9206361
FA 471884
Page 4

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	<p>BIOLOGICAL ABSTRACTS vol. 75, no. 12 , 1983, Philadelphia, PA, US; abstract no. 88129, H GEYER ET AL. 'Immunochemical properties of oligosaccharide-protein conjugates with Klebsiella K2 specificity: 2: Protective capacity of the conjugates and anti-conjugate antibodies against infection with Klebsiella pneumoniae 01:K2 in mice' * abrégé * & MED. MICROBIOL. IMMUNOL. vol. 171, no. 3, 1982, pages 135 - 1944</p>	1
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (sel. C.I.S.)
Date d'achèvement de la recherche 10 FEVRIER 1993		Examinateur p. masturzo
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'ensemble d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document interne</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons M : membre de la même famille, document correspondant</p>		

2

EPD FORM 1001 (01/81)

(19) French Republic

(11) Publication Number:
(To be used only for ordering of copies)

2 691 465

(21) National Registration Number:

92 06361

National Institute for Industrial Property

PARIS (51) Int. Cl.⁵: C 07 K 5/10, 17/10, A 61 K 37/02, 9/50, 7/00, 47/48

(12)

PATENT APPLICATION

A1

(22) Filing Date: 05.25.92

(30) Priority:

(43) Date of public disclosure of the application: 11.26.93, Bulletin 93/47.

(56) List of documents cited in the research report: listed at the end of the present section.

(60) References to other related national documents:

(71) Applicant(s): FABRE MEDICAMENT, Pierre, FR.

(72) Inventor(s): Lucien Dussourd d'Hinterland, Henri Cousse, Anne-Marie Pinel and Jean Martinez.

(73) Owner(s):

(74) Representative: Offices of Regimbeau Martin Schrimpf, Warcoin Ahner.

(54) Complexes comprising at least a peptide derived from α MSH, peptide, microsphere, medication and galenic composition comprising the same.

(57) The present invention relates to a complex of the type comprising at least a peptide, capable of inducing an antiinflammatory, antiallergic or immunosuppressant activity with interleukins of the group IL1-IL6 - α TNF, in which the peptide has a sequence with at least four acid amines derived from α MSH, as well as derivatives of these molecules in the form of salts, esters or amide, a peptide derived from α MSH and a microsphere comprising at least the complex as defined.

The invention also relates to a medication or a galenic composition comprising a complex, a peptide or a microsphere.

[page 1]

The present invention relates to a complex of the type comprising at least one peptide derived from α MSH and capable of inducing antiinflammatory, antiallergic or immunosuppressive activity with interleukins of the group IL1 - IL6 - α TNF.

Research of peptide neurotransmitters, in particular of those belonging to the class of enkephalines and endorphins, is the subject of many research activities about their role as mediators and modulators in certain kinds of vascular and nerve responses connected with skin disorders.

These peptides represent a part of the endorphine-lipotropine "system" and they are concentrated in the hypothalamic-neurohypophysis axis, which induces their synthesis. Among the peptides obtained from the same precursor "proopiomelanocortin" should be listed ACTH, α MSH and β endorphine.

α MSH or melanotropin is known for its ability to activate and regulate different processes relating to cellular induction and transduction during melanogenesis.

The present invention is based on the evidence of biological activity of peptides obtained from ACTH and from MSH, in particular when they are utilized in the form of a complex together with a polysaccharide matrix.

More specifically, the present invention relates to a complex of the type comprising at least one peptide capable of inducing antiinflammatory, antiallergic or immunosuppressive activity with interleukins of the group IL1 - IL6 - α TNF, having a sequence comprising at least four acid amines derived from α MSH, wherein said acid amines are or are not in a natural form, physically or chemically conjugated to a polysaccharide element with a high molecular weight.

Among peptide sequences that can be used according to the invention should be named sequences according to the formula:

X-GLu-His-A-Arg-Trp-Gly-Y

wherein A represents Phe or DPhe, and X and Y are chosen from:

- acid or amine functions of a corresponding amino acid,
- a sequence of amino acids not comprising any more four acid amines,

[page 2]

as well as derivatives of these molecules in the form of salts, esters or amides.

In a preferred embodiment mode of this invention, X is selected from HMet-, HNle-, H-Ser-Tyr-Ser-Met-, H-Ser-Tyr-Ser-Nle-, Ac-Nle-, Ac-Leu, Ac-Ile-, and Y is selected from -NH₂, OH.

The sequences of amino acids mentioned above can be sequences of natural amino acids or sequences of non natural amino acids, in the same way, in certain cases, some of these acids can serve certain functions, for example glycosylation; it should be, however, understood that all of these forms are included in the present description.

In the complexes according to the present invention, the polysaccharide element is preferably a cross-linked polysaccharide that can be of bacterial origin. It can be obtained for example from the *Klebsiella* type of strain, such as *Klebsiella pneumoniae*.

The complex can be realized by a chemical reaction establishing a covalent link between the polysaccharide element, which serves as a matrix for the peptide, and/or a physical conjugation in which the polysaccharide element and the peptide are uniquely linked by non covalent interactions.

This type of a complex is of particular interest because it can be easily created in the form of a microsphere, while fatty acid and/or phospholipid chains can be recovered according to a technique that has been generally described in the terminology relating to supramolecular biovectors.

This type of microparticles is advantageous as it protects the main active peptides against hydrolysis of epidermal enzymes such as exopeptidases, endopeptidases, aminopeptidases, carboxypeptidases, or dipeptidases and thus enables them to reach cellular receptors.

These microparticles or subcutaneous biovectors thus comprise in addition to the polysaccharide nucleus where the main active ingredient is located at least one lamellar layer of lipoproteins and phosphatides.

[page 3]

It is generally preferable to use a natural polysaccharide or a crosslinked polysaccharide obtained for example with treatment with epichloridrin, in which the lateral chains of peptide compounds described above are fixed. This active nucleus of the matrix realized in this manner is then surrounded by different lamellar layers of phosphatides and lipoproteins having a high molecular weight. According to a preferred embodiment mode of the present invention, the fatty acids are weakly grafted and the phospholipids are interdigitated. The diameter of these biovectors can be standardized by successive treatments with the Manton-Gaulin press with appropriate pressures. The biovectors are then lyophilized or atomized at internal temperatures of 60°C or 80°C in such a way so as to maintain the activity of the main active ingredients.

As was indicated above, the peptide derivatives of the present invention are used preferably in the form of salts, esters or amides with biochemical molecules having at least four atoms of alicyclic carbon whose role is to facilitate the bonding of peptide compounds with receptors of the G class in the cellular membranes, as well as the process of transfer by activation of AMPc. Another advantage of these particular forms is that biochemical groups known for their inhibitory activity or activity blocking phosphodiesterases are used, thus increasing the duration of the life of the complexes according to the present invention.

Among these types of derivatives should be named salts, esters or amides:

- acid alcohols
- diacids
- non natural nucleotides,

in particular acid alcohol and diacids, selected from those containing three to six carbon atoms, as well as acylated or diacylated derivatives of glycol or glycerol, for example hydroxybutyric acids or methyl hydrobutyric acids.

It is also possible to use non natural nucleotides having a triphosphate group in position three, with a CH₂ radical instead of O.

[page 4]

Among products enabling to protect the peptide chains should be named:

- methylmalonylic acid ($\text{CO}_2\text{H}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CO}_2$)
- β -hydroxybutyric acid ($\text{CH}_3-\text{CHOH}-\text{CH}_2-\text{CO}_2\text{H}$)
- β -hydroxybutyrylic acid ($\text{CH}_3-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CO}_2\text{H}$)
- diacyl glycerol
- guanosine triphosphate nucleotide, in which the triphosphate group contains in position 3 a $-\text{CH}_2$ radical replacing $-\text{O}-$.

The present invention concerns also a biologically active peptide comprising at least a sequence according to the formula:

X-Glu-His-A-Arg-Trp-Gly-Y

wherein A represents Phe or DPhe, and X is selected from HMet-, HNle-, H-Ser-Tyr-Ser-Met, H-Ser-Tyr-Ser-Nle, Ac-Nle-, Ac-Leu, Ac-Ile-, and Y is selected from $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$.

Preferably, at least one of the following sequences is comprised:

- 1) H-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly - NH_2
- 2) H-Ser-Tyr-Ser-Nle-Glu-His-DPhe-Arg-Trp-Gly - NH_2
- 3) H-Nle-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-OH
- 4) H-Nle-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly- NH_2
- 5) H-Met-Glu-His-DPhe-Arg-Trp-Gly- NH_2
- 6) Ac-Nle-Glu-His-DPhe-Arg-Trp-Gly- NH_2
- 7) Ac-Leu-Glu-His-Dphe-Arg-Trp-Gly- NH_2
- 8) Ac-Ile-Glu-His-Dphe-Arg-Trp-Gly- NH_2

in particular when they are present in the form of salts, esters or amides as described above.

The peptides 5 to 8, whose sequence have in position 4 Dphenyl amino acid, are in particular oriented toward a stimulation of the melanogenesis process by activation of melanocytic tyrosinase.

[page 5]

The peptide sequences according to the present invention can be obtained by any method known to persons in art, in particular they can be obtained by cutting from ACTH of natural origin, porcine or other, but they can be also obtained by a chemical synthesis and/or in case when peptide sequences are more important, they can be obtained by genetic recombination techniques.

In any case, while the small dimension of these peptides should be taken into account most of the time, chemical synthesis makes it possible to obtain very pure products.

Since enzymatic fragmentation is utilized, this fragmentation can be applied to a mixture of products, and in some cases it is possible to use these mixtures directly in order to realize the products according to the present invention.

The present invention also comprises peptide derivatives mentioned above, which are, however, obtained with racemization, as well as peptide synthesis of these racemized derivatives.

The racemization results in certain peptide sequences and is of interest because these molecules can be oriented toward a pharmacologic activity for specific activation of the melanogenesis with stimulation of the tyrosinases and of melanosomes.

The complexes according to this invention, the peptides as well as the microparticles such as those defined above, can be more specifically utilized in dermatologic compositions for external topical application in combination with an excipient of a known type and realized as cremes, lotions, sprays, or in other appropriate galenic forms. These dermatological compositions can be also used in cosmetology as well as in dermo-cosmetology, in which case the present invention concerns obviously medications characterized in that they comprise a complex in accordance with the description above, or a microsphere and/or a peptide such as described above.

The complexes as well as the peptides according to the invention display biological characteristics of an antiinflammatory nature,

[page 6]

of antiallergic and immunosuppressive agents with interleukins of the group IL1 - IL6 - α TNF, and they can thus be used for a great number of therapies, as well as in curing and preventing agents such as those specified below.

It goes without saying that molecules preserve a melanogenesis activation axis for stimulation of tyrosinases of melanosomes, which could be equally utilized should this appear necessary.

The present invention also concerns a galenic composition characterized by the fact that it relates to dermo-cosmetologic preparations, in the form of solutions, lotions, emulsions or cremes used as an accelerator for skin tanning and comprising at least one of the complexes or peptides described above.

Other characteristics and advantages of the present invention will become apparent from the description of the examples below.

Example 1:

Preparation of Peptide Fractions from Porcine ACTH

Fractionation was achieved with trypsin according to the SANGER technique.

The effect of trypsin is achieved preferably with the Arg and Lys links. Hydrolysis of the fraction 24 AA terminal of ACTH yielded the following peptide fragments:

1) 3 fragments of	1 A-A (146 < PM < 174)
2) 2 fragments of	3 A-A (378 < PM < 425)
3) 1 fragment of	4 A-A (PM 453)
4) 1 fragment of	8 A-A (PM 1280)
5) 1 fragment of	18 A-A (PM 2302)

Among the first 4 peptide fragments, only fragment 4 out of 8 amino acids corresponds to the terminal sequence of α MSH.

[page 7]

- 1,000 units of ACTH powder (SIGMA A 6303, 5 mg) are dissolved in 0.9 ml of Tris solution at pH 8.5.
- 500 units of Trypsine (SIGMA T, 1005) are added dissolved in 100 ml of 0.05 M Tris solution at pH 8.5 (the enzyme can be dissolved extemporaneously).
- The mixture is placed into a water bath, wherein the temperature is maintained at 25°C for 10 minutes.
- The pH value is adjusted to 4.5 and heating is applied at 100°C for 10 minutes.

Peptide fractions obtained in this manner are separated by chromatography by using gels PHARMACIA G-25 and G-15.

The difference in the molecular weights of these peptide fractions facilitates purification by chromatography through exclusion with gel Pharmacia G-25. In particular in cases of fraction 4 consisting of 8 amino acids, whose molecular weight is 1,280 daltons:

- the elution is performed with Tris solution at pH 7.5,
- the collected fractions are lyophilized and analyzed by electrophoresis (PHAST PHARMACIA) by using an acrylamide gel.

Example 2:

Synthesis of Peptide Analogs

Derivative 4 was prepared with the MERRIFIELD method starting from a chloromethylated resin (copolymer of styrene with 1% of divinyl benzene). Boc-glycine was fixed to this resin with the GISIN method. The degree of substitution is 0.6 meq of Boc-glycine per a gram of the resin. The BOC strategy was employed with the following amino acids: Boc-Trp(For), Boc-Arg(Tos), Boc-Phe, Boc-His(Boc), Boc-Glu(OBzl), Boc-Met, Boc-Nle. Reactive BOP was used as a coupling agent. The final deprotection was performed with the "Low-High" HF technique. The peptides were purified by HPLC and identified by an analysis of amino acids, or RMN with ^1H at 360 MHz.

The compounds 3, 5, 6 and 9 were prepared by using a benzhydrylamine resin (copolymer of styrene with 1% of divinyl benzene) functionalized by aminobenzyl.

[page 8]

The degree of the fixation of the first acid amine (Boc-Gly or Boc-Val) was approximately 0.5 meq/g of the resin. The BOC strategy was used with the following acids: Boc-Trp(For), Boc-Arg(Tos), BOC-Phe, Boc-His(Boc), Boc-Glu(OBzl), Boc-Met, Boc-Nle, Boc-DPhe, Boc-Pro, Boc-Lys(2-Cl-z), Boc-Gly. Acetylation of the compounds 8, 9 and 10 was performed by using AcOSu, the peptide being fixed to the resin. Reactive BOP was used as a coupling agent. The final deprotection was performed with the "Low-High" technique HF. The peptides were purified with HPLC and identified by an analysis of acid amines, or by RMN with ^1H at 360 MHz.

The physical constants of several compounds are listed by way of an example.

- (3) H-Nle-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Oh
PF = 130 °C, decomposition
[α]_D - 5 (c = 0.5 DMF).

HPLC: column C₁₈, 5 μm , rate 7 mL/min, detection 279 nm, elution solvent TFA, 0.1%/acetonitrile 77/23 v/v, retention time 28.8 min.

^1H RMN(DMSO-D₆) ppm: Nle (3.77, 1.62, 1.24, 0.82); Glu (8.53, 4.32, 1.82-1.71, 2.25); His (8.11, 4.53, 2.98-2.83); Phe (8.06, 4.47, 2.99-2.77), 7.25-7.1); Arg (8.23, 4.30, 1.69-1.55, 1.45, 3.07); Trp (8.02, 4.59, 3.16-3.00, 10.78, 7.15, 7.58, 7.30, 7.04, 6.96); Gly (8.18, 3.70).

- (4) H-Nle-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-NH₂
PF = 120 °C, decomposition.
[α]_D - 7 (c = 0.4 DMF).

HPLC: column C₁₈, 5 μm , rate 7 mL/min, detection 279 nm, elution solvent TFA, 0.1%/acetonitrile 77/23 v/v, retention time 30.45 min.

^1H RMN(DMSO-D₆) ppm: Nle (4.76, 1.62, 1.24, 0.82); Glu (8.54, 4.32, 1.86-1.72, 2.24); His (8.09, 4.53, 2.95-2.82); Phe (8.09, 4.53, 3.00-2.78, 7.3-7.0); Arg (8.36, 4.29, 1.54-1.68, 1.45, 3.07); Trp (8.07, 4.53, 3.16-3.01, 10.80, 7.19, 7.56, 7.30, 6.96); Gly (8.18, 3.67-3.54).

[page 9]

- (6) Ac-Nle-Glu-His-Dphe-Arg-Trp-Gly-NH₂
PF = 110°C decomposition
[α]_D - 31.4 (c = 0.35 DMF)

Chromatography is performed in a thin layer (silica gel plates, 60 F₂₅₄ Merck, Darmstadt, Germany):

Rf = 0.10 (ethyl acetate 50, pyridine 20, acetic acid 5, water 10).
Rf = 0.26 (ethyl acetate 40, pyridine 20, acetic acid 5, water 10).
HPLC: Merck-Hitachi equipment, column SFCC C₁₈ (10 μ M)
22.5 x 150 mm, detection 279 nm, isocratic solvent TFA 0.1%/acetonitrile 73:27, rate 7 ml/min, retention time 29.6 min.

Analysis of acid amines, HCL 6N, 110°C, 24 hours: Nle 1.00; Glu 0.95; His 0.92; Phe 0.96, Arg 0.92, Trp 0.88; Gly 0.98.

- (7) Ac-Leu-Glu-His-Dphe-Arg-Trp-Gly-NH₂
PF = 120°C, decomposition

Chromatography is performed in a thin layer (silica gel plates, 60 F₂₅₄ Merck, Darmstadt, Germany):

Rf = 0.09 (ethyl acetate 50, pyridine 20, acetic acid 5, water 10).
Rf = 0.24 (ethyl acetate 40, pyridine 20, acetic acid 5, water 10).
HPLC: Merck-Hitachi equipment, column SFCC C₁₈ (10 μ M)
22.5 x 150 mm, detection 279 nm, isocratic solvent 0.1%/acetonitrile 73:27, rate 7 ml/min, retention time 30.5 min.

Analysis of acid amines, HCL 6N, 110°C, 24 hours: Leu 1.00; Glu 0.93; His 0.92; Phe 0.94; Arg 0.93, Trp 0.85; Gly 0.97.

- (8) Ac-Ile-Glu-His-Dphe-Arg-Trp-Gly-NH₂
PF = 110°C, decomposition

Chromatography is performed in a thin layer (silica gel plates, 60 F₂₅₄ Merck, Darmstadt, Germany):

Rf = 0.11 (ethyl acetate 50, pyridine 20, acetic acid 5, water 10).
Rf = 0.26 (ethyl acetate 40, pyridine 20, acetic acid 5, water 10).

[page 10]

HPLC: Merck-Hitachi equipment, column SFCC C₁₈ (10 μ M)
22.5 x 150 mm, detection 279 nm, isocratic solvent TFA 0.1%/acetonitrile 73:27, rate 7 ml/min, retention time 29.7 min.

Analysis of acid amines, HCL 6N, 110°C, 24 hours: Ile 1.00; Glu 0.96; His 0.90; Phe 0.95; Arg 0.95, Trp 0.86; Gly 0.95.

Example 3:

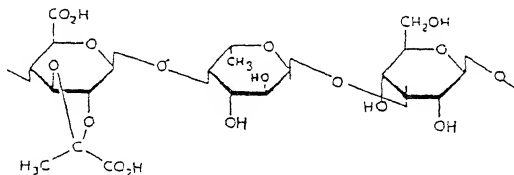
Synthesis of a complex containing a peptide conjugated with a polysaccharide element

I. Structure of the Polysaccharide Element

The polysaccharide element used in order to synthesize this complex is an exopolysaccharide secreted by the *Klebsiella pneumonia* strain of type I, coded here as DC-15.

This EPS is extracted from the culture medium after elimination of bacterial cells. After isolation and purification, the product is dried and obtained in the form of a powder that is white and very hygroscopic.

Research of the structure of DC-15 made it possible to demonstrate that it consists essentially of a monomeric form comprising D glucose, glucuronic acid, L fucose and pyruvic acid chained as shown in the diagram below:



Glucuronic acid
pyruvylated in 2, 3

L. Fucose

D-Glucose

The presence of acetal functions, enabling hydrolysis in an acid medium, leads to operations in a neutral or basic environment in order to avoid all degradation. These conditions result in important consequences on the level of the arrangement of the polysaccharide chain in the solution.

<u>Components</u>	<u>%</u>
uronic acids	23.7
glucose	18.
methyl pentose	21.2
pyruvic acid	5.6
galactose	4.8
total nitrogen	0.28
ashes	19.4
H ₂ O	13
nucleic acids	0.1
proteins	1.4

2. Reaction of DC15 with Magnesium Chloride

DC-15 (0.102 g) is dissolved in 3 ml of distilled water. One solution saturated with MgCl₂ (3 ml) is added as fractions at ambient temperature and while stirring is applied.

3. Reaction of DC-15 with Chloride of Succinic Acid

DC-15 (200 mg) is dissolved in 2 ml of distilled water. 121 mg of Na₂CO₃ is added to this solution, followed by 100 μ l of chloride of succinic acid. The mixture is maintained at ambient temperature while stirring is applied.

4. Reaction of DC-15 with Ethylene Diamine

DC-15 (100 mg) is dissolved in 1 ml of distilled water.

[page 12]

191 mg of EDC and 100 mg of N hydroxysuccinimide is added while stirring is applied. When the mixture is homogeneous, 111 μ l of ethylene diamine is added and the reaction is conducted for two hours.

5. Co-Reticulation of DC-15 and Soluble Starch

Soluble starch (9 g) and DC-15 are introduced into a 250 ml flask equipped with a stirring mechanism. 10 ml of a 3M solution of sodium hydroxide is added and stirring is conducted until a homogenous solution is obtained. 390 μ l of epichlorhydrine is then added and the reaction is allowed to take place while stirring is conducted until a gel is obtained (approximately in one hour). The resulting gel is neutralized, ground with a grinding machine containing a propeller and the salt contaminants are removed by centrifugation. The suspensions obtained are then extruded under a very high pressure (1,400 bars) with French press. Three extrusion cycles are necessary in order to obtain a homogeneous suspension of particles having a lower size of 50 nm. The ultra-ground particles are then dried in a non-aggregative manner by atomisation.

6. Acylation of Polysaccharidic Nanoparticles

500 mg of nanoparticles dispersed in 10 ml of anhydrous dichloromethane are introduced into a 5 ml flask. 400 mg of dimethyl aminopyridine (DMPA) and 400 mg of palmitic or stearic acid chloride is added. The suspension is stirred at 37°C for a period of 24 hours. The dichloromethane is then evaporated with a rotating evaporator. The acylated nanoparticles are then washed in ethanol (3 times) and then preserved in ethanol at -20°C.

7. Incorporation of Peptide Derivative 6 in Polysaccharide Acid Nuclei of 25 nm in Acylated Form, and Synthesis of BVSM

In order to prevent chemical modification of peptides incorporated in the polysaccharide nuclei during the synthesis stage after acylation,

the peptide was charged with acid nuclei acylated in advance. The examination was realized with derivative 6) of ACTH to determine 1 mol of ACTH for 2 mols of polysaccharide acid acylated by palmitic acid. After charging with the peptide, the phospholipid layer of BVSM [supramolecular biovectors] is synthesized by co-incubation with egg lecithins corresponding to 200% of the phospholipids by the weight of the acylated nuclei. These nuclei are in fact a layer of fatty acids which is not that thick and allows charging with the peptide, but which also requires introduction of a quantity of recovered phospholipids that are more important to ensure the structural stability of BVSM.

These BVSMs represent an incorporation factor of the peptide 6) ACTH by weight of the BVSM (46.6% of the weight of the acylated nuclei) with a 90% yield of the peptide incorporated with regard to the starting peptide.

It is thus possible to synthesize the BVSM charged into peptide with excellent yields, which makes it possible to reduce losses in peptides due to synthesis. It is noted in particular that during each successive attempt, the initial quantities of the peptides have been increased but the yield was always 90%.

8. Establishing a Phospholipidic Ring

A suspension of liposomes is prepared by sonication in a bath containing 75 mg of lecithines hydrogenated in 10 ml of distilled water (30 mn). 1 ml of an ethanolic suspension of acylated nuclei was progressively added while stirring was performed. The resulting suspension is then sonicated in the bath during a period of 20 minutes.

The content of pyruvic acid content was determined in the DC-15 and in the polysaccharide nuclei.

10 mg of polysaccharide is dissolved in 5 ml of HCl 0.1 N and placed in a test tube. The solution is kept for a period of 3 hours at 100°C and the temperature is then changed to ambient temperature and the solution is neutralized with 0.2 N sodium hydroxide. An assai of the hydrolyzed pyruvic acid was performed with the help of a Sigma kit based on a standard curve realized with samples of pyruvic acid markers.

[page 14]

Example 4:

Examination of the immunosuppressive activity vis-a-vis interleukin IL 1

Utilized Test:

Control of the activity of anti-IL 1 with Langerhans cells Thy 1.2⁺ and Ia⁺ of the mouse C 57 BL/6.

1. Material and Methods

Male mice C 57 - BL/6, from 5 to 7 weeks old, distributed in groups of 4 per cage, with a free access to water and food, subjected to a light cycle of 12 hours of light per 24 hours, received every day during a period of 5 consecutive days a topical application of the peptide in propylene glycol (a volume of 50 μ m), in the dorsal or aural facet.

On day 6, the animals were sacrificed. This was followed by prewashing of the aural facet and by separation of the dorsal facet and the ventral facet.

The tissues of the dorsal facet were immersed in EDTA of Na (0.20 M) for a period of 2 hours at 37°C.

After incubation, the epidermis was prewashed in the form of an intact layer fixed with acetone and rehydrated in PBS (phosphate buffer).

The CED (epidermal dendritic cells) Thy 1-2⁺ Ia⁺ were identified by double labeling with indirect immunofluorescence.

The number of the cells per mm² was determined by peripheral zones on the same surface for each epidermal layer.

The CED "epidermal dendritic cells" carrying the marker Ia⁺ were identified by using a monoclonal antibody anti-Ia⁺.

The epidermal layers were fixed in acetone and then incubated during a period of 1 hour at 37°C in the presence of monoclonal anti-Ia⁺ antibodies and labeled by using the indirect immunoperoxidase method (kit).

After incubation during a period of 10 minutes at 37°C with a solution of amino ethyl carbazole, the preparation was washed in PBS.

The CED Thy 1.2⁺ were identified by double labeling with indirect immunofluorescence. The epidermal layers were fixed in acetone and then rehydrated in PBS.

The tissues were labeled at the same time by mice antibodies anti-Thy 1.2⁺ diluted 1:100 during a period of 16 hours at 4°C. The samples of the tissue were washed three times in PBS during a period of 60 minutes and then incubated for 60 minutes at 37°C with goat anti-rabbit antibodies coupled to fluorescein. (Fluorescein was diluted 1:20 in PBS. The tissues were then washed in PBS before they were mounted as described above).

The markers comprising the epidermal layers that were not labeled by primary antibodies were uniquely incubated in the presence of secondary reagents in order to provide evidence of eventual reactions crosslinked with conjugated antibodies of rhodamine and fluorescein.

The number of the Langerhans Ia⁺ cells or of CED Thy 1.2⁺ per square millimeter was determined in four peripheral zones of the same surface for each epidermal layer. At least four animals were studied in each of the groups. The concentration of the Langerhans Ia⁺ cells and of CED Thy 1.2⁺ is indicated for each measurement.

2. Results

Table 1 summarizes the results providing evidence of immunosuppressive activity of the peptides according to the invention obtained from lots of 4 C57-BL6 mice.

Already at the concentration of 0.1 ng, the peptides caused a decrease in the incidence of dendritic epidermal phenotypes of the class Thy 1.2⁺, and the effect was amplified at the concentration of 1 ng. In return, the peptides remained under the effect of the phenotypes of the dendritic epidermal cells of the class Ia⁺ which is advantageous as it does not interfere with the functioning of the immunitary cutaneous system and provides a demonstration of a specific immunosuppressive action.

[page 16]

These results also show that the peptides according to the invention, corresponding to fragments (4-10) of α -MSH have a more pronounced effect than a molecule of α -MSH (1-10) by itself.

Example 5:

Examination of Melanogenesis

The difficulties encountered during attempts to obtain normal melanocytes "in vitro" or large populations of melanocytes originating in animal tissues make it necessary for researchers to utilize tumoral cells of melanomas of mice.

These techniques, which made it possible to acquire a better level of knowledge about the fundamental mechanisms, are poorly suitable for evaluation of said molecules of activators of melanogenesis.

These tumoral cells normally secrete in an abundant manner tyrosinase, which creates a major inconvenience as it amplifies the results, in particular because these are compounds based on tyroxine.

As melanogenesis is dependant on neuropeptides activating tyrosinase; a valid evaluation of this activation can be conducted only with melanocytes normal in a culture.

A culture of melanocytes of embryos of amphibians was employed as an experimental model in this case, as their limbic system is close to that of mammals, which makes it possible to realize screening of different molecules with a significant statistics precision.

Embryonated eggs of great crested grebe (*Tritus Cristatus*) were utilized.

The melanocytes were of neural origin. They were prewashed during the first days of embryogenesis in the neurectoderm and placed in a culture in the BARTH'S medium, enriched in endoderm and containing the grown dilutions of peptides to be testes.

After incubation at 25°C during a period of 24 hours, the activity of the peptide components was estimated based on an assay of the melanin contained in the melanosomes, which was compared to non-simulated test specimens.

The rate of melanin per cell was estimated direction in a confocal Zeiss scanning laser microscope (S.M.L. Zeiss) with fluorescence.

1. Material and Methods

The melanocytes are prewashed with the help of an automatic micropipette of an inverted Zeiss microscope, provided with equipment for cellular surgery.

The embryos are immobilized in a manipulation chamber of the microscope in a physiological medium and nitrogen atmosphere.

The prewashing is conducted with a precision, and monitored on a monitoring screen connected to a programming computer.

The prewashed melanocytes are placed in the culture in a BARTH'S medium containing 3.5% of paraformaldehyde for a period of 30 minutes at 22°C. Washing is performed twice with the help of BARTH'S medium.

The cultures are then placed for incubation into BARTH'S medium conditioned with 1% of an extract of triton from the endoderm of the embryo at the temperature of 22°C.

Dilutions of peptide hormones are added for cultivation by using 0.5 mg - 1 mg - and 1.5 mg per 50 µl.

The culture is then allowed to be incubated during a period of 24 hours at 22°C. The cells are delicately centrifugated with 300 g during a period of 3 minutes.

The cells are then placed for rapid incubation into BARTH'S medium in the presence of isothiocyanate of fluorescein FITC for a period of 30 minutes.

After washing with 3.5% of paraformaldehyde in BARTH'S solution and centrifugation, the cells are put in a suspension and fixed on microscope plates according to conventional methods.

[page 18]

The melanin assay is performed with an analysis achieved with a confocal microscope by using microscope Zeiss S.L.M.

The measurements are conducted with an argon laser by using 488 nm and 514 nm in fluorescence with a 63 x Plan-Neofluar objective in a preprogrammed operation mode.

Each individual image is displayed on a screen and stored on a disk.

The rates of melanin per cell and the number of the treated cells and the test specimens are then printed out directly in the form of a graph with the help of a computer connected to the microscope.

2. Results

Table II indicates the results of peptide sample (3) tested and compared to the test specimen. The test specimen was a cellular culture in BARTH'S medium, not activated.

Three series of the cellular cultures were realized according to strictly identical protocol.

The doses of the peptide hormones were standardized at 0.1 - 0.5 - 1. And 1.5 mg.

The rates of dopa-melanin are expressed in μg per one hundred thousand cells.

Table 1

Samples	Doses Nanog. (Ng)	NUMBER OF CELLS OF Thy 1.2 ⁺ and 1a ⁺ per mm ² of the epiderm										
		Thy 1.2 ⁺ Cells				Median	g	1a ⁺ Cells				
		1	2	3	4			1	2	3	4	
Test Specimens PG	-	380	376	387	410	388	T	498	502	500	510	
	I	0.1	298	302	310	305	303	22	490	495	496	500
		0.5	300	290	305	300	298	23.2	480	488	490	498
		1	268	265	280	276	272	29.9	476	482	487	499
	II	0.1	290	280	285	292	286	26.3	418	445	435	450
		0.5	276	268	270	286	275	29.2	415	432	430	445
		1	260	262	260	270	263	32.3	415	420	425	432
	III	0.1	323	320	318	321	320	17.6	490	500	495	505
		0.5	318	315	310	316	320	17.6	488	498	480	500
		1	316	312	310	312	312	19.6	488	495	478	492

Results indicated for 4 lots of C.57.BL-6 Mice

I: Hydroxybutyryl (4-10) ACTH

II: Hydroxybutyryl (4-10) ACTH

III: (1-10) α MSH

Table II

Tested Specimens	Doses Nanograms	Melamine in micrograms per 1.10^5 cells				Median
		Series I	Series II	Series II	Series II	
Test Specimen Peptide	-	0.28 μ g	0.33 μ g		0.35 μ g	0.35 μ g
	0.1 ng	2.15 μ g	2.22 μ g		2.30 μ g	2.22 μ g
	0.5 ng	3.65 μ g	3.55 μ g		3.60 μ g	3.60 μ g
	1 ng	3.55 μ g	3.60 μ g		3.65 μ g	3.60 μ g
	1.5 ng	3.10 μ	3.15 μ		3.10 μ	3.17 μ

H-Nle-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-OH (3)

[page 21]

Example 6:

Pharmacology

Two products were comparatively tested for evolution of cutaneous hypersensitivity:

JL 641, peptide number 6, in lyophilized form

JL 5, peptide number 6, in the form of a polysaccharide complex.

1. Material and Methods

Female C57 BL/6 mice, 5 weeks old, were divided into 7 lots containing 10 animals (5 per cage) with free access to water and food, and subjected to a light cycle of 12 hours of light per 24 hours. The animals in the lots I, II and III received every day a topical application on shaved skin on the back of the mice of JL 641 lyophilized (put into a solution of propylene glycol) with a constant volume of 50 μ l and during 5 consecutive days.

The animals in the lots IV, V and VI received JL 641 in the same manner prepared in the form of polysaccharide nanosomes according to example 3, coded JL 641 B.

The following three doses were retained for each product:

JL 641: Lot I: 2.5 μ g/mouse/day
 Lot II: 0.5 μ g/mouse/day
 Lot III: 0.1 μ g/mouse/day

JL 641 B: Lot IV: 2.5 μ g/mouse/day
 Lot V: 0.5 μ g/mouse/day
 Lot VI: 0.1 μ g/mouse/day

The animals in lot VII served as a test specimen (they received only μ l of propylene glycol as a topical application).

On day 3, thirty minutes after the last application, all the mice were sensitized with 25 μ l of DNFB (2,4-dinitro-1 fluoro benzene in a 2% mixture of 4:1 acetone and triolefin) applied onto the dorsal region of shaved skin.

[page 22]

On day 6, the test continued with a new sensitization by the application of DNFB.

On day 11, the thickness of the ears of the mice was measured with a micrometer in order to obtain base values and the ears were then stimulated by the application of 20 μ l of DNFB at 0.8%.

On day 12, the thickness of the ears was measured again. The median value of the thickness of the ears was established for the mice in the lots I, II, III, IV V and VI who had received the products that were studied, and also for the mice in lot VII who received only propylene glycol.

The percentage of eventual suppression was expressed by the following formula:

$$\frac{T - E}{T} \times 100$$

T represents the median thickness of the ears in the test specimen lot and the median thickness of the ears in different lots.

2. Results:

The results are listed below in Tables V and VI:

Table V

PERCENTAGE OF SUPPRESSION COMPARED TO TEST SPECIMEN LOT ACCORDING TO THE FORMULA: $\frac{T - E}{T} \times 100$					
LOT I <u>JL 641 LYOPHILIZED</u> 2.5 μ g/mouse/day		LOT II <u>JL 641 LYOPHILIZED</u> 0.5 μ g/mouse/day		LOT III <u>JL 641 LYOPHILIZED</u> 0.1 μ g/mouse/day	
Left Ear	Right Ear	Left Ear	Right Ear	Left Ear	Right Ear
- 31.53	- 32.50	- 30.67	- 30.63	- 30.14	- 31.65

Table VI

PERCENTAGE OF SUPPRESSION COMPARED TO TEST SPECIMEN LOT ACCORDING TO THE FORMULA: $\frac{T - E}{T} \times 100$					
LOT IV <u>JL 641 B</u> 2.5 µg/mouse/day		LOT V <u>JL 641 B</u> 0.5 µg/mouse/day		LOT VI <u>JL 641 B</u> 0.1 µg/mouse/day	
Left Ear	Right Ear	Left Ear	Right Ear	Left Ear	Right Ear
- 67.66	- 67.89	- 67.38	- 70.28	- 53.27	- 55.66

An examination of the tables shows that the activity of peptide JL 641 in lyophilized form administered by way of topical administration reduces the cutaneous hypersensitivity reaction by about 30%.

The same peptide in the form of microcapsules of nanosomes having a polysaccharide structure (JL 641 B) induced a strong decrease of cutaneous hypersensitivity comprising between 53 and about 70%.

These results show not only a good activity of the peptide itself, but also a potentialization that was not expected in particular when it is coupled with a polysaccharide.

CLAIMS

1. A complex of the type comprising at least a peptide capable of inducing antiinflammatory, antiallergic or immunosuppressant activity with interleukins of the group IL1-IL6 - α TNF, wherein the peptide has a sequence with at least four acid amines derived from α MSH, whether said acid amines are present in a natural form or not, conjugated physically or chemically with a polysaccharide element having a high molecular weight.
2. The complex according to claim 1, characterized by the fact that the polysaccharide element is a crosslinked polysaccharide.
3. The complex according to claim 2, characterized by the fact that the polysaccharide is of bacterial origin.
4. The complex according to claims 1 through 3, characterized by the fact that the polysaccharide originates in a strain of *Klebsiella pneumoniae*.
5. The complex according to claims 1 through 4, characterized by the fact that it comprises a peptide according to the formula:



wherein A represents Phe or DPhe, and X and Y are selected from:

- acid or amino functions of a corresponding amino acid,
- an amino acid sequence comprising no more than four amino acids,
- as well as derivatives of these molecules in the forms of salts, esters or amides.

6. The complex according to claim 1 through 5, characterized by the fact that X is selected from HMet-, Hnle-, H-Ser-Tyr-Ser-Met-, H-Ser-Tyr-Ser-Nle-, Ac-Nle-, Ac-Leu-, Ac-Ile-, and Y is chosen from among -NH₂, -OH.
7. The complex according to claim 1 through 6, characterized by the fact that the derivatives are selected from salts, esters and amides of biochemical groups inhibiting or blocking phosphodiesterases.

8. The complex according to claims 1 through 7, characterized by the fact that the derivatives of peptides are selected from salts, esters, or amides of

- acid alcohols,
- diacids
- non natural nucleotides.

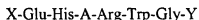
9. The complex according to claims 1 through 8, characterized by the fact that the acid alcohols and diacids are selected from acids containing from three to six atoms of carbon and the acylated or diacylated derivatives from glycol or glycerol.

10. The complex according to claims 1 through 9, characterized by the fact that the acid alcohols are hydrobutyric acids and hydroxybutyric methyl.

11. The complex according to claims 1 through 10, characterized by the fact that the non-natural nucleotides form a triphosphate group in position 3 with a -CH₂ radical instead of -O-.

12. The complex according to one of the claims 1 through 11, characterized by the fact that they comprise at least one sequence of partially racemized amino acids.

13. A biologically active peptide, characterized by the fact that it comprises at least one sequence according to the formula:



wherein in this formula, A represents Phe or DPhe, X is selected from among HMet-, HNle-, H-Ser-Tyr-Ser-Met-, H-Ser-Tyr-Ser-Nle, Ac-Nle-, Ac-Leu-, Ac-Ile, and Y is selected from -NH₂, -OH.

14. The peptide according to claim 13, characterized by the fact that it is selected from the sequences:

- 1) H-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly - NH₂
- 2) H-Ser-Tyr-Ser-Nle-Glu-His-DPhe-Arg-Trp-Gly - NH₂
- 3) H-Nle-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-OH
- 4) H-Nle-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-NH₂
- 5) H-Met-Glu-His-DPhe-Arg-Trp-Gly-NH₂
- 6) Ac-Nle-Glu-His-DPhe-Arg-Trp-Gly-NH₂

[page 26]

- 7) Ac-Leu-Glu-His-Dphe-Arg-Trp-Gly-NH₂
- 8) Ac-Ile-Glu-His-Dphe-Arg-Trp-Gly-NH₂

as well as derivatives of these molecules in the form of salts, esters or amides.

- 15. Peptides according to one of the claims 13 and 14, characterized by the fact that they are selected from salt, esters or amides of biochemical groups inhibiting or blocking phosphodiesterases.
- 16. Peptides according to one of the claims 13 to 15, characterized by the fact that they comprise at least one sequence of partially racemized amino acids.
- 17. A microsphere, characterized by the fact that it contains at least one complex according to one of the claims 1 through 12, coated with layers of fatty acids and/or phospholipids.
- 18. A microsphere according to claim 17, characterized by the fact that the fatty acids are weakly grafted and that the phospholipids are interdigitated.
- 19. A medication, characterized by the fact that it comprises a complex according to claims 1 through 12, a peptide according to claim 13 through 16, or a microsphere according to claim 17 and 18, administered via oral route or injectable.
- 20. A galenic composition for external topical application, characterized by the fact that it comprises a complex according to claims 1 through 12, a microsphere according to claims 17 and 18, or a peptide according to claim 13 through 16.
- 21. A galenic composition according to claim 20, characterized by the fact that it is a dermatologic composition which can be utilized in cosmetology, as well as in dermo-cosmetology.
- 22. A galenic composition according to one of the claims 20 and 21, characterized by the fact that it relates to dermo-cosmetologic preparations in the form of solutions, lotions, emulsions or cremes used as an accelerator for skin tanning and comprising at least one of the complexes or peptides according to claims 1 through 16.

FRENCH REPUBLIC

SEARCH REPORT

2691465

National Registration No.

NATIONAL INSTITUTE issued based on the last claims

FR 9206361

for INDUSTRIAL PROPERTY filed before the search was begun

FA 471884

Page 1

DOCUMENTS CONSIDERED RELEVANT		Claims relevant to the examined application	
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passage		
X	EP-A-0 381 070 (FARMHISPANIA SA), August 8, 1990, * page 6, line 13 - page 6, line 16 * ---	1-2, 5-6	
X	NL-A-6 509 727 (ORGANON NV), January 30, 1967 * example 2 * ---	13-14, 16	
X	EP-A-0 232 697 (A BERTOLINI), August 19, 1987 * claim 1 * ---	13-14, 16-19	
X	EP-A-0 146 113 (D ADERHOLD), June 26, 1985 * claim 4 * ---	13, 14	
X	EP-A-0 292 291 (UNIVERSITY PATENTS INC), November 23, 1988, * the entire document * ---	13-14, 16, 19	
A	WO-A-9 003 798 (CANCER RESEARCH CAMPAIGN TECHNOLOGY LIMITED), April 19, 1990 * claim 1 * ---	1	Searched Technical domains (Int. Cl.5)
X	PEPTIDES, Vol. 10, No. 2, February 1989 FAYETTEVILLE, NY, USA, pages 361 - 368, B.E. BECKWITH ET AL. 'the effects of structure-conformation modifications of melanotropin analogs on learning and memory; d-amino acid substituted linear and cyclic analogs', * compound 4, table 1 * --- -/-	13-16, 19	CO7K A61K

2 EPO FORM 1503 0182 (PO413)

Date of the completion of the search: February 10, 1993	Examiner: p. masturzo
CATEGORIES OF CITED DOCUMENTS:	T: theory or principle on which the invention is based
X: document of particular relevance per se	E: patent document published on or after the filing date
Y: document of particular relevance in combination with another document in the same category	D: cited in the application
A: relevant in connection with at least one claim or with general prior art technology	L: cited for other reasons
O: Non-written disclosure	
P: Intercalary document	"&": member of the same family, corresponding document

FRENCH REPUBLIC

SEARCH REPORT

National Registration No.

NATIONAL INSTITUTE issued based on the last claims
for INDUSTRIAL PROPERTY filed before the search was begun

2691465

FR 9206361

FA 471884

Page 2

DOCUMENTS CONSIDERED RELEVANT		Claims relevant to the examined application	
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passage		
X	JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, Vol. 30, No. 11, November 1987, WASHINGTON, US pages 2126 - 2130, V. J. HRUBY ET AL. 'alpha-melanotropin: the minimal active sequence in the frog skin bioassay' * table 1 * ---	13-16, 19	
X	CHEMICAL ABSTRACTS, Vol. 112, No. 19, May 7, 1990, Columbus, Ohio, US; abstract no. 172440r, M. LOW ET AL. 'role of chain termini in selective steroidogenic effect of ACTH/MSH (4-10) on isolated adrenocortical cells' page 96, column G; & PEPTIDES Vol. 11, No. 1, 1990, FAYETTEVILLE, NY, USA, pages 29 - 31 ---	13-16, 19	TECHNICAL DOMAINS EXAMINED (Int. Cl. 5)
X	CHEMICAL ABSTRACTS, Vol 100, No. 1, January 2, 1984, Columbus, Ohio, US; abstract No. 630p J. M. VAN REE 'the influence of neuropeptides related to pro-opiomelanocortin on acquisition of heroin self-administration of rats', page 54; column DR; & LIFE SCIENCES, Vol., 33, No. 23, 1983, pages 2283 - 22 89 --- /--	13-16, 19	

2 EPO FORM 1503 0182 (PO413)

Date of the completion of the search: February 10, 1993	Examiner: p. masturzo
CATEGORIES OF CITED DOCUMENTS:	T: theory or principle on which the invention is based
X: document of particular relevance per se	E: patent document published on or after the filing date
Y: document of particular relevance in combination with another document in the same category	D: cited in the application
A: relevant in connection with at least one claim or with general prior art technology	L: cited for other reasons
O: Non-written disclosure	-----
P: Intercalary document	"&": member of the same family, corresponding document

FRENCH REPUBLIC

SEARCH REPORT

2691465

National Registration No.

NATIONAL INSTITUTE issued based on the last claims

FR 9206361

for INDUSTRIAL PROPERTY filed before the search was begun

FA 471884

Page 3

DOCUMENTS CONSIDERED RELEVANT		Claims relevant to the examined application	
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passage		
X	CHEMICAL ABSTRACTS, Vol. 98, No. 13, March 28, 1983, Columbus, Ohio, US; abstract no. 10774t, H. P. C. DRIESSEN Et AL., 'synthesis of an analog of alpha-MSH (1-10) decapeptide as a substrate for enzymic n-alpha-acetylation' page 642; column DR; * abbreviated * & INT. J. PEPT. PROT. RES., Vol. 20, No. 4, 1982 page 289 - 297 ---	13-16, 19	
X	CHEMICAL ABSTRACTS, Vol. 93, No. 17, October 27, 1980, Columbus, Ohio, US; abstract no. 161661b, J. M. STEWART ET AL. 'inhibition of development of tolerance to morphine by a peptide related to ACTH' page 107; column GA; * abbreviated * & ADV. BIOCHEM. PSYCHOPHARMACOL. Vol. 22, 1980, pages 305 - 312 --- -/--	13-16, 19	TECHNICAL DOMAINS EXAMINED (Int. Cl. 5)

2 EPO FORM 1503 0182 (P0413)

Date of the completion of the search: February 10, 1993	Examiner: p. masturzo
CATEGORIES OF CITED DOCUMENTS:	T: theory or principle on which the invention is based
X: document of particular relevance per se	E: patent document published on or after the filing date
Y: document of particular relevance in combination with another document in the same category	D: cited in the application
A: relevant in connection with at least one claim or with general prior art technology	L: cited for other reasons
O: Non-written disclosure	
P: Intercalary document	"&": member of the same family, corresponding document

FRENCH REPUBLIC

NATIONAL INSTITUTE
for INDUSTRIAL PROPERTY

SEARCH REPORT

issued based on the last claims

filed before the search was begun

2691465

National Registration No.

FR 9206361

FA 471884

Page 4

DOCUMENTS CONSIDERED RELEVANT		Claims relevant to the examined application	
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passage		
A	<p>BIOLOGICAL ABSTRACTS, Vol. 75, No. 12, 1983, Philadelphia, PA, US; abstract no. 88129, H. GEYER ET AL. 'immunochemical properties of oligosaccharide-protein conjugates with Klebsiella K2 specificity: 2 : Protective capacity of the conjugates and anti-conjugate antibodies against infection with Klebsiella pneumoniae 01:K2 in mice' * abbreviated * & MED. MICROBIOL. IMMUNOL. Vol. 171, No. 3, 1982, pages 135 1944</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1	TECHNICAL DOMAINS EXAMINED (Int. Cl. 5)

2 EPO FORM 1503 0182 (PO413)

Date of the completion of the search: February 10, 1993	Examiner: p. masturzo
CATEGORIES OF CITED DOCUMENTS:	T: theory or principle on which the invention is based
X: document of particular relevance per se	E: patent document published on or after the filing date
Y: document of particular relevance in combination with another document in the same category	D: cited in the application
A: relevant in connection with at least one claim or with general prior art technology	L: cited for other reasons
O: Non-written disclosure	-----
P: Intercalary document	"&": member of the same family, corresponding document

